



Beschreibung

EP 0 943 685 A2

BB

(19) European Patent Office
 (12) EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG
 (11) EP 0 943 685 A2

(43) Veröffentlichungstag:

22.09.1998 Patentblatt 1998/38

(21) Anmeldenummer: 99 01164.4

(22) Anmeldetag: 22.01.1999

(51) Int. Cl. 6: C12N 15/12, C07K 14/705,
 C07K 16/28, A61K 48/00,
 C12Q 1/68, G01N 33/576,
 G01N 33/68, C12N 5/10

Gene und Verwendung.
 [0002] G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stellen eine Superfamilie integraler Membranproteine dar. Familienmitglieder sind Rezeptoren für alle Typen chemischer Botenstoffe, aber auch Sensoren für Licht und Geruch. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kommen in fast allen Organismen vor.

[0003] Die Rezeptoren sind charakterisiert durch eine Aminosäuresequenz mit 7 ausgesparten hydrophoben Bereichen. Diese stellen hochswahrscheinlich membranständige Domänen dar und geben der Familie ihren zweiten Namen: 7-Tрансмембранные Домены Rezeptоров.

[0004] Die Lipiddomein dieser Rezeptorfamilie sind mit biologen Aminen (z.B. Adrenalin, Serotonin, Histamin), Peptidhormonen (z.B. Angiotensin, Endothelin, Bradykinin), Neurotransmittern (z.B. NPY, Substanz P, Opiode) und Proteinen (z.B. Chymotripsin, Thrombin) sehr vielfältig. Alle diese Messenger sind durch Interaktion mit G-Proteinen an der Signalübertragung in das Innere der Zelle beteiligt. Als Effektoren sind bekannt: Adenylylzyklase, Phospholipase C, Phosphodiesterase.

[0005] Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren werden in drei Unterfamilien unterteilt: die Rhodopsin-Unterfamilie, Calciumionen-Unterfamilie und G-Protein/metabotropic-Unterfamilie.

[0006] Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Protein, enthaltend die in SEQ ID NO.2 dargestellte Aminosäuresequenz oder eine daraus durch Substitution, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten erhältliche Sequenz, wobei wenigstens noch eine der wesentlichen biologischen Eigenschaften des in SEQ ID NO.2 dargestellten Proteins erhalten bleibt.

[0007] Die wesentliche biologische Eigenschaft ist in der Aktivität als Rezeptor, insbesondere als G-Protein-gekoppelte Rezeptor zu sehen.

[0008] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Proteine mit G-Protein-gekoppelter Rezeptoraktivität, die ausgetauscht von der in SEQ ID NO.2 dargestellten Aminosäuresequenz durch gezielte Veränderungen herstellbar sind. Beispielsweise können bestimmte Aminosäuren durch solche mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften (Raumverfügung, Basizität) ersetzt werden. Es können aber auch ein oder mehrere Aminosäuren hinzugefügt oder entfernt werden, oder mehrere dieser Maßnahmen miteinander kombiniert werden. Die solchermaßen sichtbaren der SEQ ID NO.2 veränderten Proteine besitzen wenigstens 50 %, bevorzugt wenigstens 15 % Homologie zu SEQ ID NO.2, berechnet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 2444-2448.

[0009] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuresequenzen, die für die o.g. Proteine codieren, insbesondere solche mit der in SEQ ID NO.1 dargestellten Primärstruktur.

[0010] Die vorliegende cDNA kann durch den Formmann geltäugliche Kultivierungs- und Transfektionsmethoden in verschiedensten Expressionssystemen zur Expression gebracht werden. Dies sind beispielsweise pro- oder eukaryotische Vektorssysteme, wie SV40, CMV, Bakteriavirus, Adenovirus, Plasmide, Pragente, Phagen.

[0011] Dazu wird die erfundungsgemäße Nukleinsäuresequenz üblicherweise mit gentechnischen Regulationselementen wie Transkriptions- und Translationssignallen funktionell verknüpft. Mit den solchermaßen hergestellten rekombinanten Nukleinsäurekonstruktionen werden anschließend Wirtszellen transformiert.

[0012] Eine bevorzugte Ausführungform ist die Verknüpfung der erfundungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit einem Promotor, wobei der Promotor 5' upstream zu liegen kommt. Weitere Regulationssignale wie Terminator, Polyadenyllierungssignale, Enhancer können in dem Nukleinsäurekonstrukt Anwendung finden.

[0013] Als Wirtszellen sind Bakterien wie Escherichia coli, eukaryotische Mikroorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae*, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise St59 oder CHO-Zellen, geeignet.

[0014] Gewünschtes kann das Garprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, z.B. Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden.

[0015] Bei der vorliegenden Erfindung handelt es sich um eine neue Mitglied der G-Protein-gekoppelten Rezeptorfamilie kodiert. Sequenzvergleiche zeigen Verwandtschaft mit Endothelinrezeptoren und Endothelinrezeptor-ähnlichen Sequenzen.

[0016] Die vorliegende Nukleinsäuresequenz wurde ursprünglich in mehreren cDNA-Bibliotheken aus humanem Gehirn und Rückenmark identifiziert. Die Analyse der Verteilung der zugehörigen mRNA in 50 verschiedenen menschlichen Geweben ergab fast ausschließliche Expression im Gehirn.

[0017] Das durch die vorliegende cDNA kodierte Polypeptid läßt sich zweifelsfrei als G-Protein-gekoppelte Rezeptor identifizieren. Die 7 Transmembran-Domänen, das Kennzeichen dieser Prostinfamilie, lassen sich leicht im Hydrophobitäts-Plot (Kyte, J. and R.F. Doolittle, 1982, J. Mol. Biol. 157, 105-132 (1982)) finden. Die größte Verwandtschaft auf

55 Aminosäurebausteine findet sich mit 52 % Identität zu einem putativen Endothelinrezeptor Typ Bähnlichen Protein humanen Ursprungs (Genbank Accessions Nummer U87460, Fasta-Programm, Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85, 2444-2448).

[0018] In besonderen Fällen kann das Garprodukt auch in transgenen Tieren, z.B. Mäusen, Schafen oder transgenen

Pflanzen zur Expression gebracht werden. Ebenso ist es möglich, zellfreie Translationssysteme mit der entsprechenden RNA zu programmieren.

[0019] Darüberhinaus kann das Seroprototyp auch in Form therapeutisch oder diagnostisch geeigneter Fragmente exprimiert werden. Zur Isolation des rekombinanten Proteins können Vektorsysteme oder Oligoribonukleotide verwendet werden, die die cDNA um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptida Kodieren, die einer einfacheren Reinigung dienen. Als solche "Tags" sind in der Literatur z.B. Hexa-Histidin-Anker bekannt oder Epitope, die als Antigene verschiedenster Antikörper erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (N.Y.) Press).

[0020] Ausgehend von der Peptidsequenz können synthetische Peptide generiert werden, die als Antigene für die Produktion von Antikörpern eingesetzt werden. Es ist auch möglich, das Polypeptid oder Bruchstücke davon zur Generierung von Antikörpern einzusetzen.

[0021] Die Herstellung von Antikörpern ist eine dem Fachmann gewöhnige Tätigkeit. Mit Antikörpern sind sowohl polyclonale monoklonale, humane oder rumanierte Antikörper oder Fragmente davon, singule chain Antikörper oder auch synthetische Antikörper gemeinsam.

[0022] Die vorliegende cDNA bietet außerdem die Voraussetzung, die genomische Sequenz dieses neuen G-Protein-gekoppelten Rezeptors zu klonieren. Darunter fällt auch die daszugehörige regulatorische oder Promotorsequenz, die beispielweise durch Sequenzierung des 5' upstream Bereichs des vorigen cDNA zugänglich wird. Diese Sequanzinformation der cDNA ist auch die Grundlage für die Herstellung von antisense Molekülen oder Ribozymen.

[0023] Eine weitere Möglichkeit des Einsatzes der Nukleotidsequenz oder Teilen davon ist die Erzeugung transgener Tiere. Transgene Überexpressor oder genetischer Knoblauch der Sequenzinformation in geeigneten Tiermodellen kann wertvolle weitere Informationen über die (Patho-)Physiologie des neuen G-Protein-gekoppelten Rezeptors.

[0024] In Situationen, in denen ein Mangel an dem beschriebenen Rezeptor (Protein gemäß Anspruch 1) herrscht, können mehrere Methoden zur Substitution eingesetzt werden. Zum einen kann das Protein, natürlich oder rekombinant direkt, oder durch geeignete Maßnahmen in Form seiner kodierenden Nukleinsäure (DNA oder RNA) appliziert werden. Dazu kommen sowohl virale, als auch nichtvirale Vehikel zum Einsatz. Kommt

[0025] Ein weiterer Weg bietet sich durch die Stimulation des endogenen, körpereigenen Genes durch geeignete Mittel. Auch der turn-on- oder die turn-off- oder die halfindierung z.B. durch Rezeptorkinasen können blockiert werden. Schließlich können Agonisten dieses Rezeptors zum Einsatz gelangen.

[0026] In Situationen, in denen überschüssiger Rezeptor vorliegt, können verschiedene Inhibitoren eingesetzt werden. Diese Inhibition kann sowohl durch antisense Moleküle oder Ribozyme, oder Antikörper und Oligonukleotide, als auch durch niedermolekulare Verbindungen erreicht werden. Darüberhinaus kann der Rezeptor auch durch Antagonisten blockiert werden.

[0027] Weiterhin können die cDNA, die genomische DNA, der Promotor, als auch das Polypeptid, sowie Teillängen davon in rekombinanter oder nichtrekombinanter Form zur Ausarbeitung eines Testsystems verwendet werden. Dieses Testsystem ist geeignet, die Aktivität des Promotors oder des Proteins in Anwesenheit einer Testsubstanz zu messen. Bevorzugt handelt es sich dabei um einfache Methode (colorimetrischer, lumineszentischer, fluorimetrischer, immunologischer oder radioaktiver Art), die die schnelle Meßbarkeit einer Vielzahl von Testsubstanz erlauben. Die Bezug zum neuen Rezeptor zu beschreiben.

[0028] Die Bestimmung von Menge, Aktivität und Verteilung des Rezeptors oder seiner zugrundeliegenden mRNA im menschlichen Körper kann zur Diagnose, Prädposition und zum Monitoring bei bestimmten Erkrankungen dienen. Dergleichen kann die Sequenz der cDNA sowie die genetischen Sequenzen zu Aussagen über genetische Ursachen und Prädpositionen bestimmter Erkrankungen herangezogen werden. Dazu können sowohl DNA/RNA-Proteine, sowie unnatürliche DNA/RNA-Proteine, als auch Antikörper verschiedenster Art benutzt werden. Dabei dient die beschriebene Nukleotidsequenz oder Teile davon in Form geeigneter Proben zur Aufdeckung von Punktmutationen oder Deletions/Insersionen.

[0029] Weiterhin kann das beschriebene Protein benutzt werden, um seine natürlichen Liganden zu bestimmen und zu isolieren. So kann der Rezeptor rekombinant in Zellkultur exprimiert und sein Aktivierungszustand z.B. anhand des cAMP-Spiegels abgeleitet werden. Der cAMP-Spiegel lässt sich immunologisch oder mittels Reportertechnologie ermitteln. Damit ergibt sich auch ein diagnostisches Verfahren zur Aufdeckung von Punktmutationen oder Deletions/Insersionen.

[0030] Die entdeckungsgemäße Nukleinsäuresequenz und das von ihr kodierte Protein können zur Entwicklung von Reagienzen, Agonisten und Antagonisten zur Diagnose und Therapie von chronischen und akuten Erkrankungen des zentralen und peripheren Nervensystems, wie Alzheimer's, Depression, Demenz, Motorikstörungen, Hirntumore, Schmerz, Schizophrenie, Angstzustände, Schlafapnoe, Schlaganfall, Schizophrenie, Psychosen, Parkinsons, Epilepsie, ALS, Drogenabhängigkeit, Lähmungen, sowie zur Cerebroprotection und bei Erkrankungen mit nervöser Komponente, wie Obesity, Autonome, Bullarie eingesetzt werden.

[0031] Ein weiterer Gegenstand der Erforschung ist Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis einer Nukle-

insäure nach Anspruch 3 in einer biologischen Probe, das folgende Schritte umfaßt:

a) Inkubation einer biologischen Probe mit einer bekannten Menge an Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder einer bekannten Menge an Oligoribonukleotiden, die als Primer für eine Amplifikation der Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 geeignet sind.

b) Nachweis der Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 durch spezifische Hyridisierung oder PCR-Amplifikation

c) Vergleich der Menge an hybridisierender Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder an durch PCR Amplifikation gewonnener Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 mit einem Standard.

[0032] Weiterhin umfaßt die Erforschung ein Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis eines Proteins gemäß Anspruch 1 in einer biologischen Probe, das folgende Schritte umfaßt:

d) Inkubation einer biologischen Probe mit einem Antikörper, der spezifisch gegen das Protein gemäß Anspruch 1 gerichtet ist.

e) Nachweis des Antikörper/Antigenkomplexes.

f) Vergleich der Mengen des Antikörper/Antigenkomplexes mit einem Standard.

[0033] Als Standard können biologische Proben wie Gewebestücke, Serum oder Blut dienen, die von gesunden Probanden entnommen wurden.

[0034] Bei der Sequenzanalyse von cDNA-Klonen einer cDNA-Bibliothek aus menschlichem Gehirn wurde zunächst eine Teilsequenz identifiziert. Die Sequenz dieses Teilkontos umfaßt den Bereich zwischen Nukleotidposition 352 und 2411 in SEQ ID NO:1.

[0035] Aus einer cDNA-Bibliothek aus menschlichem Gehirn (Human Brain 5'Stretch Plus cDNA Library, # HL5018L, Fa. Clontech, Jahr 1997) wurde die Gesamtsequenz SEQ ID NO:1 mittels geschachtelter Polymerase Chain Reaktion amplifiziert. Dazu kamen folgende Oligonukleotidprimere zu Anwendung:

[0036] PCR1: mit SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 4;
PCR2: mit SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 5.

Beispiel 2

Klonierung der Rezeptor cDNA

[0037] Bei der Sequenzanalyse von cDNA-Klonen einer cDNA-Bibliothek aus menschlichem Gehirn wurde zunächst eine Teilsequenz identifiziert. Die Sequenz dieses Teilkontos umfaßt den Bereich zwischen Nukleotidposition 352 und 2411 in SEQ ID NO:1.

[0038] Aus einer cDNA-Bibliothek aus menschlichem Gehirn (Human Brain 5'Stretch Plus cDNA Library, # HL5018L, Fa. Clontech, Jahr 1997) wurde die Gesamtsequenz SEQ ID NO:1 mittels geschachtelter Polymerase Chain Reaktion amplifiziert. Dazu kamen folgende Oligonukleotidprimere zu Anwendung:

[0039] PCR1: mit SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 4;
PCR2: mit SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 5.

Beispiel 3

Expression des neuen Rezeptors in menschlichen Geweben

[0040] Die Expression des neuen Rezeptors wurde in 50 verschiedenen menschlichen Geweben mittels RNA-Dot-blot-Analyse untersucht. Ein Blot der Firma Clontech (#7770-1) wurde dazu mit einer Rezeptor-Probe hybridisiert. Die Probe wurde durch *in vitro* Transkription der entsprechenden cDNA in Anwesenheit Digoxigentin-markierter Nukleotide hergestellt. Nach stringentem Waschen wurde das Transcript hauptsächlich in Gehirngewebe nachgewiesen.

[0041] Ein weiterer Gegenstand der Erforschung ist Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis einer Nukle-

EP 0 943 685 A2

EP 0 943 685 A

SEQUENCE LISTING

tcc aag agg ggc acc gag gat gag gac aag gtc	196	
Ser Lys Arg Gly Thr Glu Asp Glu Glu Ala Lys Glu Val Glu Gln Tyr	45	
45	50	55
gtg cct gag gag tgg ggc gag tac ccc cgg ccc att cac cct gct ggc	244	
Val Pro Glu Glu Thr Ala Glu Tyr Pro Arg Pro Ile His Pro Ala Gly	60	
60	65	70
cgt cag cca acc aag ccc ttg gtg gcc acc agc cct aac ccc gac aag	292	
Ile Gln Pro Thr Lys Pro Leu Val Ala Thr Ser Pro Asn Pro Asp Lys	65	
Leu Gln Pro Thr Lys Pro Leu Val Ala Thr Ser Pro Asn Pro Asp Lys	80	
80	85	90
gtt ggg ggc acc cca gac agt ggg cag gag gaa ctg agg ggc aat ctg aca	340	
Asp Gly Gly Thr Pro Asp Ser Gly Gin Glu Leu Arg Gly Asn Leu Thr	95	
95	100	105
ggg gca cca ggg gag cta cag atc cag sac acc ccc ctg tar ccg gtg	388	
Gly Ala Pro Gly Gln Arg Leu Gln Ile Glu Asn Pro Leu Tyr Pro Val	110	
110	115	120
acc gag agr tcc tac agr gtc tat gcc atc atg ctt ctg gcg ctg gtg	436	
Tyr Glu Ser Ser Tyr Ser Ala Tyr Ala Ile Met Leu Leu Ala Leu Val	125	
125	130	135
gtg ttt gct gct ggc att gtg ggc aac acg ctg tcg gtc atg tgc atc gtg	484	
Val Phe Ala Val Gly Ile Val Gly Asn Leu Ser Val Met Cys Ile Val.	140	
140	145	150
tag cac agr tac tac ctg aag agc gac tgg eac tcc atc ctt ggc gac	532	
Tyr His Ser Tyr Tyr Leu Lys Ser Ala Thr Asn Ser Ile Leu Ala Ser	160	
160	165	170
ctg gcc ctc tag gat ttt ctg gtc ctc ttt ttc tgc ccc cct att gtc	580	
Ile Ala Leu Ile Asp Phe Leu Val Leu Phe Phe Cys Ile Pro Ile Val	175	
175	180	185
atc ttc aac gag atc acc aag cag agg cta ctg ggt gag gtc ttg tct	628	
Ile Phe Asn Glu Ile Thr Lys Gin Arg Leu Leu Gly Asp Val Ser Cys	190	
190	195	200
cgt gcc gtc ccc ttc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acc act ttc	676	
Arg Ala Val Pro Phe Met Glu Val Ser Ser Leu Gly Val Thr Thr Phe	205	
205	210	215
atc ctc tgt gcc ctg ggc att gag cgc ttc ctc gac gtc acc aac	724	
Set Leu Cys Ala Leu Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr	220	
220	225	230

SEQUENCE LISTING

5

45

<110> BASF Aktiengesellschaft
<120> Neuer G-Protein gekoppelter Rezeptor aus menschlichem Hirn

<130> OZ 0050/48774

<140>

<141>

<150> DE 19805151.7
<151> 1998-02-11

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> 5'UTR

<222> (1) .. (19)

<220>

<221> CDS

<222> (20) .. (1462)

<220>

<221> 3'UTR

<222> (1463) .. (2411)

<220>

<221> tRNA

<222> (1463) .. (2411)

<400> 1

gtccctcgat catccagcc atg cgg tgg ctg tgg ccc ctg gtc tct ttt
Met Arg Trp Leu Trp Pro Leu Ala Val Ser Leu

1 5 10 15 20 25

gtc gtg att ttg gtc gtg ggg cta agc agg gtc tct tgg ggt gcc ccc
Ala Val Ile Leu Ala Val Gly Ieu Ser Arg Val Ser Gly Gly Ala Pro

15 20 25 30 35 40 45 50

ctg cac ctg ggc agg cac aga gcc gag acc cag gag cag cgg agc cga
Leu His Leu Gly Arg His Arg Ala Glu Thr Gln Glu Gln Gln Ser Arg

30 35 40 45 50

EP 0943 685 A2

Leu Pro Lys Val Arg Pro Ile Glu Arg Cys Gln Ser Ile Leu Ala Lys
 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440
 ttg gct gtc atc tgg ggc tcc atc acg ctc gct gtg cct gag ctc
 Leu Ala Val Ile Trp Val Gly Ser Met Thr Leu Ala Val Pro Glu Leu
 5 820 868 906 944 982 1020 1058 1096 1134 1172 1210 1248 1286 1324 1362 1400 1438 1476 1514 1552 1590 1628 1666 1704 1742 1780 1818 1856 1894 1932 1970 2008 2046 2084 2122 2160 2198 2236 2274 2312 2350 2388 2426 2464 2502 2540 2578 2616 2654 2692 2730 2768 2806 2844 2882 2920 2958 2996 3034 3072 3110 3148 3186 3224 3262 3300 3338 3376 3414 3452 3490 3528 3566 3604 3642 3680 3718 3756 3794 3832 3870 3908 3946 3984 4022 4060 4098 4136 4174 4212 4250 4288 4326 4364 4402 4440
 ctg ctg tgg ctg gca cag gag cct gcc ccc acc atg ggc acc ctg
 Leu Leu Trp Gln Leu Ala Gln Glu Pro Thr Met Gly Thr Leu
 10 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440
 gac tca tgc arc arg aaa ccc tca gcc agc ctc ccc gag tcc ctc tat
 Asp Ser Cys Ile Met Lys Pro Ser Ala Ser Leu Pro Glu Ser Leu Tyr
 15 916 964 1012 1060 1108 1156 1204 1252 1290 1338 1376 1414 1452 1490 1528 1566 1604 1642 1680 1718 1756 1794 1832 1870 1908 1946 1984 2022 2060 2098 2136 2174 2212 2250 2288 2326 2364 2402 2440 2478 2516 2554 2592 2630 2668 2706 2744 2782 2820 2858 2896 2934 2972 3010 3048 3086 3124 3162 3200 3238 3276 3314 3352 3390 3428 3466 3504 3542 3580 3618 3656 3694 3732 3770 3808 3846 3884 3922 3960 3998 4036 4074 4112 4150 4188 4226 4264 4302 4340 4378 4416
 tca ctg gtg atg acc tac cag aac gec cgc atg tgg tgg tac ttt gtc
 Ser Leu Val Met Thr Tyr Gln Asn Ala Arg Met Trp Tyr Phe Gly
 20 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440
 tgc tac ttc tgc ctc atc ctc tca aca gtc acc tgc cag ctg gtg
 Cys Tyr Phe Cys Leu Pro Ile Leu Phe Thr Val Thr Cys Gln Leu Val
 25 964 1012 1060 1108 1156 1204 1252 1290 1338 1376 1414 1452 1490 1528 1566 1604 1642 1680 1718 1756 1794 1832 1870 1908 1946 1984 2022 2060 2098 2136 2174 2212 2250 2288 2326 2364 2402 2440 2478 2516 2554 2592 2630 2668 2706 2744 2782 2820 2858 2896 2934 2972 3010 3048 3086 3124 3162 3200 3238 3276 3314 3352 3390 3428 3466 3504 3542 3580 3618 3656 3694 3732 3770 3808 3846 3884 3922 3960 3998 4036 4074 4112 4150 4188 4226 4264 4302 4340 4378 4416
 aca tgg gtg cta ggc cct cca ggg agg aag tca gag tgc agg gcc
 Thr Trp Arg Val Arg Gly Pro Glu Arg Lys Ser Gln Cys Arg Ala
 30 1060 1108 1156 1204 1252 1290 1338 1376 1414 1452 1490 1528 1566 1604 1642 1680 1718 1756 1794 1832 1870 1908 1946 1984 2022 2060 2098 2136 2174 2212 2250 2288 2326 2364 2402 2440 2478 2516 2554 2592 2630 2668 2706 2744 2782 2820 2858 2896 2934 2972 3010 3048 3086 3124 3162 3200 3238 3276 3314 3352 3390 3428 3466 3504 3542 3580 3618 3656 3694 3732 3770 3808 3846 3884 3922 3960 3998 4036 4074 4112 4150 4188 4226 4264 4302 4340 4378 4416
 agc aac cac gag cag tgt gag agc cag ctc aac agc acc gtc gag ggc
 Ser Lys His Glu Gln Cys Glu Ser Gln Leu Asn Ser Thr Val Val Gly
 35 1108 1156 1204 1252 1290 1338 1376 1414 1452 1490 1528 1566 1604 1642 1680 1718 1756 1794 1832 1870 1908 1946 1984 2022 2060 2098 2136 2174 2212 2250 2288 2326 2364 2402 2440 2478 2516 2554 2592 2630 2668 2706 2744 2782 2820 2858 2896 2934 2972 3010 3048 3086 3124 3162 3200 3238 3276 3314 3352 3390 3428 3466 3504 3542 3580 3618 3656 3694 3732 3770 3808 3846 3884 3922 3960 3998 4036 4074 4112 4150 4188 4226 4264 4302 4340 4378 4416
 ctg acc gtg gtc tac gcc ttc tgc acc ctc cca gag aac gtc tgc aac
 Leu Thr Val Val Tyr Ala Phe Cys Thr Leu Pro Glu Asn Val Cys Asn
 40 1156 1204 1252 1290 1338 1376 1414 1452 1490 1528 1566 1604 1642 1680 1718 1756 1794 1832 1870 1908 1946 1984 2022 2060 2098 2136 2174 2212 2250 2288 2326 2364 2402 2440 2478 2516 2554 2592 2630 2668 2706 2744 2782 2820 2858 2896 2934 2972 3010 3048 3086 3124 3162 3200 3238 3276 3314 3352 3390 3428 3466 3504 3542 3580 3618 3656 3694 3732 3770 3808 3846 3884 3922 3960 3998 4036 4074 4112 4150 4188 4226 4264 4302 4340 4378 4416
 atc gtg gtg gcc tac ctc tcc acc gag ctg acc cgc cag acc ctg gag
 Ile Val Val Ala Tyr Leu Ser Thr Gln Leu Thr Arg Gln Thr Leu Asp
 45 1204 1252 1290 1338 1376 1414 1452 1490 1528 1566 1604 1642 1680 1718 1756 1794 1832 1870 1908 1946 1984 2022 2060 2098 2136 2174 2212 2250 2288 2326 2364 2402 2440 2478 2516 2554 2592 2630 2668 2706 2744 2782 2820 2858 2896 2934 2972 3010 3048 3086 3124 3162 3200 3238 3276 3314 3352 3390 3428 3466 3504 3542 3580 3618 3656 3694 3732 3770 3808 3846 3884 3922 3960 3998 4036 4074 4112 4150 4188 4226 4264 4302 4340 4378 4416
 acc cca gtg ctg ctc ctt tgc acc tgc agg ctc gag gcc gag ttc
 Thr Pro Val Leu Leu Leu Cys Ile Cys Arg Pro Leu Gln Ala Phe
 50 1300 1348 1396 1434 1472 1510 1548 1586 1624 1662 1700 1738 1776 1814 1852 1890 1928 1966 2004 2042 2080 2118 2156 2194 2232 2270 2308 2346 2384 2422 2460 2498 2536 2574 2612 2650 2688 2726 2764 2802 2840 2878 2916 2954 2992 3030 3068 3106 3144 3182 3220 3258 3296 3334 3372 3410 3448 3486 3524 3562 3600 3638 3676 3714 3752 3790 3828 3866 3904 3942 3980 4018 4056 4094 4132 4170 4208 4246 4284 4322 4360 4398 4436 4474 4512 4550 4588 4626 4664 4702 4740 4778 4816 4854 4892 4930 4968 4996 5034 5072 5110 5148 5186 5224 5262 5300 5338 5376 5414 5452 5490 5528 5566 5604 5642 5680 5718 5756 5794 5832 5870 5908 5946 5984 6022 6060 6098 6136 6174 6212 6250 6288 6326 6364 6402 6440 6478 6516 6554 6592 6630 6668 6706 6744 6782 6820 6858 6896 6934 6972 6996 7034 7072 7110 7148 7186 7224 7262 7300 7338 7376 7414 7452 7490 7528 7566 7604 7642 7680 7718 7756 7794 7832 7870 7908 7946 7984 8022 8060 8098 8136 8174 8212 8250 8288 8326 8364 8402 8440 8478 8516 8554 8592 8630 8668 8706 8744 8782 8820 8858 8896 8934 8972 8996 9034 9072 9110 9148 9186 9224 9262 9300 9338 9376 9414 9452 9490 9528 9566 9604 9642 9680 9718 9756 9794 9832 9870 9908 9946 9994 10032 10070 10108 10146 10184 10222 10260 10298 10336 10374 10412 10450 10488 10526 10564 10602 10640 10678 10716 10754 10792 10830 10868 10906 10944 10982 11020 11058 11096 11134 11172 11210 11248 11286 11324 11362 11400 11438 11476 11514 11552 11590 11628 11666 11704 11742 11780 11818 11856 11894 11932 11970 12008 12046 12084 12122 12160 12198 12236 12274 12312 12350 12388 12426 12464 12502 12540 12578 12616 12654 12692 12730 12768 12806 12844 12882 12920 12958 12996 13034 13072 13110 13148 13186 13224 13262 13300 13338 13376 13414 13452 13490 13528 13566 13604 13642 13680 13718 13756 13794 13832 13870 13908 13946 13984 14022 14060 14098 14136 14174 14212 14250 14288 14326 14364 14402 14440 14478 14516 14554 14592 14630 14668 14706 14744 14782 14820 14858 14896 14934 14972 15010 15048 15086 15124 15162 15200 15238 15276 15314 15352 15390 15428 15466 15504 15542 15580 15618 15656 15694 15732 15770 15808 15846 15884 15922 15960 15998 16036 16074 16112 16150 16188 16226 16264 16302 16340 16378 16416 16454 16492 16530 16568 16606 16644 16682 16720 16758 16796 16834 16872 16910 16948 16986 17024 17062 17100 17138 17176 17214 17252 17290 17328 17366 17404 17442 17480 17518 17556 17594 17632 17670 17708 17746 17784 17822 17860 17898 17936 17974 18012 18050 18088 18126 18164 18202 18240 18278 18316 18354 18392 18430 18468 18506 18544 18582 18620 18658 18696 18734 18772 18810 18848 18886 18924 18962 19000 19038 19076 19114 19152 19190 19228 19266 19304 19342 19380 19418 19456 19494 19532 19570 19608 19646 19684 19722 19760 19798 19836 19874 19912 19950 19988 20026 20064 20102 20140 20178 20216 20254 20292 20330 20368 20406 20444 20482 20520 20558 20596 20634 20672 20710 20748 20786 20824 20862 20900 20938 20976 21014 21052 21090 21128 21166 21204 21242 21280 21318 21356 21394 21432 21470 21508 21546 21584 21622 21660 21698 21736 21774 21812 21850 21888 21926 21964 22002 22040 22078 22116 22154 22192 22230 22268 22306 22344 22382 22420 22458 22496 22534 22572 22610 22648 22686 22724 22762 22800 22838 22876 22914 22952 22990 23028 23066 23104 23142 23180 23218 23256 23294 23332 23370 23408 23446 23484 23522 23560 23598 23636 23674 23712 23750 23788 23826 23864 23902 23940 23978 24016 24054 24092 24130 24168 24206 24244 24282 24320 24358 24396 24434 24472 24510 24548 24586 24624 24662 24700 24738 24776 24814 24852 24890 24928 24966 24996 25034 25072 25110 25148 25186 25224 25262 25300 25338 25376 25414 25452 25490 25528 25566 25604 25642 25680 25718 25756 25794 25832 25870 25908 25946 25984 26022 26060 26098 26136 26174 26212 26250 26288 26326 26364 26402 26440 26478 26516 26554 26592 26630 26668 26706 26744 26782 26820 26858 26896 26934 26972 27010 27048 27086 27124 27162 27200 27238 27276 27314 27352 27390 27428 27466 27504 27542 27580 27618 27656 27694 27732 27770 27808 27846 27884 27922 27960 27998 28036 28074 28112 28150 28188 28226 28264 28302 28340 28378 28416 28454 28492 28530 28568 28606 28644 28682 28720 28758 28796 28834 28872 28910 28948 28986 29024 29062 29100 29138 29176 29214 29252 29290 29328 29366 29404 29442 29480 29518 29556 29594 29632 29670 29708 29746 29784 29822 29860 29898 29936 29974 30012 30050 30088 30126 30164 30202 30240 30278 30316 30354 30392 30430 30468 30506 30544 30582 30620 30658 30696 30734 30772 30810 30848 30886 30924 30962 31000 31038 31076 31114 31152 31190 31228 31266 31304 31342 31380 31418 31456 31494 31532 31570 31608 31646 31684 31722 31760 31808 31846 31884 31922 31960 32008 32046 32084 32122 32160 32208 32246 32284 32322 32360 32408 32446 32484 32522 32560 32608 32646 32684 32722 32760 32808 32846 32884 32922 32960 33008 33046 33084 33122 33160 33208 33246 33284 33322 33360 33408 33446 33484 33522 33560 33608 33646 33684 33722 33760 33808 33846 33884 33922 33960 34008 34046 34084 34122 34160 34208 34246 34284 34322 34360 34408 34446 34484 34522 34560 34608 34646 34684 34722 34760 34808 34846 34884 34922 34960 35008 35046 35084 35122 35160 35208 35246 35284 35322 35360 35408 35446 35484 35522 35560 35608 35646 35684 35722 35760 35808 35846 35884 35922 35960 36008 36046 36084 36122 36160 36208 36246 36284 36322 36360 36408 36446 36484 36522 36560 36608 36646 36684 36722 36760 36808 36846 36884 36922 36960 37008 37046 37084 37122 37160 37208 37246 37284 37322 37360 37408 37446 37484 37522 37560 37608 37646 37684 37722 37760 37808 37846 37884 37922 37960 38008 38046 38084 38122 38160 38208 38246 38284 38322 38360 38408 38446 38484 38522 38560 38608 38646 38684 38722 38760 38808 38846 38884 38922 38960 39008 39046 39084 39122 39160 39208 39246 39284 39322 39360 39408 39446 39484 39522 39560 39608 39646 39684 39722 39760 39808 39846 39884 39922 39960 40008 40046 40084 40122 40160 40208 40246 40284 40322 40360 40408 40446 40484 40522 40560 40608 40646 40684 40722 40760 40808 40846 40884 40922 40960 41008 41046 41084 41122 41160 41208 41246 41284 41322 41360 41408 41446 41484 41522 41560 41608 41646 41684 41722 41760 41808 41846 41884 41922 41960 42008 42046 42084 42122 42160 42208 42246 42284 42322 42360 42408 42446 42484 42522 42560 42608 42646 42684 42722 42760 42808 42846 42884 42922 42960 43008 43046 43084 43122 43160 43208 43246 43284 43322 43360 43408 43446 43484 43522 43560 43608 43646 43684 43722 43760 43808 43846 43884 43922 43960 44008 44046 44084 44122 44160 44208 44246 44284 44322 44360 44408 44446 44484 44522 44560 44608 44646 44684 44722 44760 44808 44846 44884 44922 44960 45008 45046 45084 45122 45160 45208 45246 45284 45322 45360 45408 45446 45484 45522 45560 45608 45646 45684 45722 45760 45808 45846 45884 45922 45960 46008 46046 46084 46122 46160 46208 46246 46284 46322 46360 46408 46446 46484 46522 46560 46608 46646 46684 46722 46760 46808 46846 46884 46922 46960 47008 47046 47084 47122 47160 47208 47246 47284 47322 47360 47408 47446 47484 47522 47560 47608 47646 47684 47722 47760 47808 47846 47884 47922 47960 48008 48046 48084 48122 48160 48208 48246 48284 48322 48360 48408 48446 48484 48522 48560 48608 48646 48684 48722 48760 48808 48846 48884 48

EP 0 943 685 A2

THE END

EP 0 943 685 A2

9. Verwendung eines Proteins nach Anspruch 1 als Antigen zur Erzeugung von spezifischen Antikörpern.
10. Antikörper, die spezifisch das Protein nach Anspruch 1 erkennen.
- 5 11. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz zur Gentherapie.
12. Verwendung einer zu der Sequenz gemäß Anspruch 3 komplementären Nukleinsäuresequenz zur Gentherapie.
- <210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> Homo sapiens
- 10 <400> 3
ctcggaagc ggcgcattgt gtttgt
26
- 15 <210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> Homo sapiens
- 20 <400> 4
gagccacc agatgacacgc caactt
26
- 25 <210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> Homo sapiens
- 30 <400> 5
tgaaaggcac ggcacgacaa gaaaacg
26
- 35
- Patentansprüche**
1. Isoliertes Protein, enthaltend die in SEQ ID NO:2 dargestellte Aminosäuresequenz oder eins daraus durch Substitution, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäurenresten erhaltenliche Sequenz, wobei wenigstens noch eine der wesentlichen biologischen Eigenschaften des in SEQ ID NO:2 dargestellten Proteins erhalten bleibt.
 2. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein humanes Protein handelt.
 3. Nukleinsäuresequenz codierend für ein Protein nach Anspruch 1.
 4. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Protein codiert, das wenigstens 40 60 % Identität mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Sequenz hat.
 5. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie in SEQ ID NO:1 dargestellte Sequenz enthält.
 6. Rekombinantes Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 3 funktionell verknüpft mit mindestens einem genetischen Regulationselement.
 7. Wirtsorganismus, transformiert mit einem rekombinanten Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 6.
 8. Wirtsorganismus, transformiert mit einem rekombinanten Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 6.
- 55 50 45 40 30 25 20 15 10 5 55 50 11 12